

(Translation of Citation 2)

Patent Public Disclosure No. 313437/89

Laid open on December 18, 1989

Patent Application No. 146258/88

Filing Date: June 14, 1988

Applicant: Nippon Institute for Biological Science
Tokyo, Japan

Title of Invention

Granulated live vaccine for administration into feed,
process for production thereof and live vaccine for preventing
fowl coccidiosis

Claims

1. A granulated live vaccine for administration into feed containing granular sodium alginate whose diameter is several millimeters and wherein an effective ingredient in the live vaccine is incorporated.
2. (not translated)
3. The granulated live vaccine for administration into feed according to claim 1 or 2 wherein the effective ingredient in said live vaccine is oocysts of fowl coccidial protozoan.

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平1-313437

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成1年(1989)12月18日

A 61 K 39/00

A 23 K 1/16

A 61 K 39/012

3 0 4

G-8829-4C

Z-6754-2B

D-6754-2B

8829-4C 審査請求 未請求 請求項の数 7 (全6頁)

⑮ 発明の名称 飼料内投与用の粒子状生ワクチン及びその製法並びに鶏コクシジウム症生ワクチン

⑯ 特 願 昭63-146258

⑰ 出 願 昭63(1988)6月14日

⑱ 発 明 者 大 永 博 資 東京都立川市栄町3-41-4

⑲ 発 明 者 東 郷 正 治 東京都秋川市小川1344-196 サウスイースト秋川202

⑳ 出 願 人 財団法人日本生物科学研究所 東京都青梅市新町2221番地1

㉑ 代 理 人 弁理士 谷山 輝雄 外3名

明 細 書

1. 発明の名称

飼料内投与用の粒子状生ワクチン及びその製法並びに鶏コクシジウム症生ワクチン

2. 特許請求の範囲

- 1 生ワクチンの有効成分が混入された数mm直径のアルギン酸ナトリウムからなる飼料内投与用の粒子状生ワクチン。
- 2 着色料が混入されて赤色等に着色されていることを特徴とする請求項1に記載の飼料内投与用の粒子状生ワクチン。
- 3 生ワクチンの有効成分が鶏コクシジウム原虫のオーシストであることを特徴とする請求項1又は2に記載の飼料内投与用の粒子状生ワクチン。
- 4 請求項1に記載の飼料内投与用粒子状生ワクチンを製造する方法であって、生ワクチンの有効成分をアルギン酸ナトリウム溶液に混入する工程と、生ワクチン主剤を混入した該

アルギン酸ナトリウム溶液を固形化用溶液中に滴下する工程を有することを特徴とする粒子状生ワクチンの製法。

- 5 アルギン酸ナトリウム溶液の濃度が1~2%であることを特徴とする請求項4に記載の粒子状生ワクチンの製法。
- 6 生ワクチンの有効成分が鶏コクシジウム原虫のオーシストであることを特徴とする請求項4又は5に記載の粒子状生ワクチンの製法。
- 7 請求項1ないし3のいずれかに記載の粒子状生ワクチンを添加混合したことを特徴とする飼料。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、代表的には飼用に用いられる飼料内投与用の粒子状生ワクチンおよびその製法、並びに鶏コクシジウム症生ワクチンに関するものである。

(発明の背景)

本発明が代表的な対象とする鶏コクシジウム症は、鶏コクシジウム原虫の感染を原因とする寄生性腸炎として知られ、日本国内全域のみならず全世界に蔓延し、養鶏産業に対して多大の経済的被害を与えることから重要疾病の一つとされている。

本症の感染は、オーシストと呼ばれる微細な原虫卵を感受性鶏が経口摂取することにより起こり、原虫は腸管上皮細胞内で一定の发育過程を経た後、再びオーシストとして鶏糞中に排泄される。被害は原虫の増殖による腸管組織の破壊、およびそれに伴う栄養吸収障害として起こる。また本症は鶏糞中のオーシストが感染源となるため、鶏糞が増積して鶏によるオーシストの摂取が容易な平飼い条件下で本症は高率に発生する。従って、特に平飼い飼育されるブロイラーおよび種鶏が本症対策の重要な対象となる。

ところで、一般にブロイラーについては、飼

料添加による予防剤の投与が鶏出荷の1週間前まで適用可能であることから本症の対策は予防剤の投与により一定程度解決でき、そのためブロイラーではこの問題は現状においてそれほど重要性が高いとは言えないが、他方種鶏については、予防剤の使用が飼料安全法により入産時から10週齢までに限定されている。このためその後の飼養期間では鶏は無防備の状態におかれ、対策上なんらかの措置が必要となる。

本症による種鶏の主要な被害は、成鶏が採卵開始後、すなわち卵の生産期間中に感染を受け発病した場合に、卵の生産性が極度に低下することにある。

(従来の技術)

以上の対策として、種鶏に育成段階で軽度の感染を受けさせ、これにより獲得した免疫で生産開始後の重篤感染を防御させる方法が考えられる。例えば各地の種鶏場で問題になる本症の一つである急性型鶏コクシジウム症の原因種であるアイメリア テネラ (*Eimeria tenella*)

3

及びアイメリア ネカトリックス (*Eimeria necatrix*) については特に顕著な免疫付与が要求される。

このような免疫付与のために用いられる鶏コクシジウム症ワクチンは、弱毒の種鶏に対して、数を調整した上記種のオーシストを投与し、軽度の感染を起こさせて免疫を付与するものである。

ところで一般に、鶏用生ワクチンのうち経口投与により使用されるものはそれぞれのワクチンにおいて投与条件が厳密に指定されており、操作上の繁雑性を有する。例えば飲水投与については、ワクチン取得の鶏個体間における均一性を保つ必要があり、個体ごとに投与するものについては、それに要する作業労力及び鶏に対する保定の影響が問題である。

(発明が解決しようとする課題)

これに対し生ワクチンの飼料投与は、これらの問題の解決、特に投与操作の簡便化を図る上で有効であると考えられ、更に投与が簡単であ

4

るためワクチンの連日投与の可能性からその有用性は高い。また一定時間給餌を中断して、空腹状態にさせた鶏の固体間における飼料要求のバラツキは比較的少ないものと考えられ、従って、ワクチン摂取のバラツキも少ないことも、好ましい傾向として予想される。

この生ワクチン鶏の飼料投与に関しては、その本体である微生物が一定期間飼料中で安定した活力を維持すること、飼料中に均一に混合できることの条件等が求められる。

しかしながら微生物またはその芽胞液などは安定性の問題から直接飼料に混合できない場合が多く、従って、飼料混合に適合する状態を作出す必要である。

また各種ワクチンの混合および同時投与の可能性なども課題である。

本発明者は以上のような観点から鋭意研究を進めてなされたものであり、飼料投与用として適した生ワクチンの提供を目的とする。

また本発明の別の目的は、かかる生ワクチン

を簡便に作製することができ、製造法を提供するところにある。

また更に本発明の他の目的は、上記した熱コクシウム症生ワクチンを提供することにある。

(発明が解決しようとする課題)

上記目的を実現するためになされた本発明の特徴の一つは、生ワクチンの有効成分が混入された数 μ m直径のアルギン酸ナトリウムからなる飼料内投与用の粒子状生ワクチンを提供することにある。

アルギン酸ナトリウム粒子は比較的簡単な装置、材料で作製でき、このアルギン酸ナトリウム原体には毒性が全くなく、粒子内部に浸透性を保つことができ、一旦、固形化したのち各種の緩衝液、生理食塩液、蒸留水等に浸漬しても溶解せず、免疫増強剤、保存料、抗生物質、抗真菌剤、着色料、着香料等の混入が可能という利点がある。任意的に含ませ得る成分は、ワクチン有効成分の安定性に関する緩衝液、塩類

溶液等や保護剤、有効成分の免疫増強効果に関係する免疫増強剤、細菌類の混入、増殖を防ぎ、結果的にワクチン粒子の腐敗、変質等を防除する保存料、抗生物質、抗真菌剤等、またワクチンの視覚的効果を高め鶏へのワクチンの取込みを増進させるとともに、取扱い便利にする着色料などがある。着香料は鶏の嗜好性増進を目的として用いられる。

ワクチンの有効成分の安定性に関する緩衝液、塩類溶液等は、一方アルギン酸ナトリウムの溶解溶液にもなり、具体的には、生理食塩液、りん酸緩衝生理食塩液、ハンクス塩類溶液、アール塩類溶液、リンゲル液、蒸留水などが例示できる。

ワクチンの有効成分の安定性に関する保護剤にはペプトン、トリプトース、グルタミン酸ナトリウム、脱脂粉乳、乳糖、果糖、蔗糖などが例示できる。

経口用ワクチンの免疫増強剤として具体的にはサポニン、レバミゾール、レクチンなどが例

示できる。

また直径2~5 μ m程度の球状粒子を作製でき、粒子自体に粘着性はないため容易に飼料混合でき、着色した場合にはその効果により取扱が容易となる。

上記の飼料内投与用の粒子状生ワクチンは、次のようにして製造される。

飼料内投与用の粒子状生ワクチンであるアルギン酸ナトリウム粒子の作製は、例えば各種生ワクチンに適切な蒸留水等の溶液で、1~2%(w/v)程度の濃度にアルギン酸ナトリウム溶液を調整し、次にこのアルギン酸ナトリウム液に生ワクチンの有効成分等を混合して滴下装置に送液し、固形用溶液である例えば1~10%(w/v)の塩化カルシウム液に対し、注射針等の毛細管を先端に装着した滴下装置を利用することにより、上記アルギン酸ナトリウム液を10~25 μ mづつ滴下することで行なうことができる。これによりアルギン酸ナトリウムはカルシウムイオンを採って瞬時に固形化し、球状の

粒子を形成する。

この粒子を例えば30~100メッシュ程度の網に受容させ、当該ワクチンに適切な洗浄液等で洗浄してワクチン瓶等に分注すればよい。もしワクチンの種類に応じて適度の乾燥が必要とされるなら、洗浄した粒子を網に受け、余分の液体を除去できる状態で例えば3~5日間程度保存し、その後瓶に詰めることもできる。

上記粒子の作製に使用するアルギン酸ナトリウムは、加熱した液体に市販のアルギン酸ナトリウム粉末を添加し溶解することで調整するのが適当である場合が多い。

粒子を作成するためのアルギン酸ナトリウム液の濃度は1~2%(w/v)が適当である。上記粒子を236(J15)の注射針を用いて作成した場合1%アルギン酸ナトリウム液1滴当りの液量は約13.1 μ l、粒子20コの平均重量は4.18 \pm 1.21mgであり、また、2%アルギン酸ナトリウム液1滴当りの液量は13.2 μ l、粒子20コの平均重量は7.88 \pm 0.71mgである。一方186(J15)の

注射針を用いて液を滴下すると、粒子20コの平均重量は $12.46 \pm 0.41 \mu\text{g}$ で、粒子径は $2.9 \mu\text{m}$ となる。

アルギン酸ナトリウム液の凝固は、 120°C 、10分以下の加熱で実施することができる。

アルギン酸ナトリウム液を滴下して固形化させる溶液としては、例えば塩化カルシウム（無水）、塩化カルシウム（2水和塩）、塩化カルシウム（6水和塩）、酢酸カルシウム、アスコルビン酸カルシウム、ほう酸カルシウム、臭化カルシウム、くえん酸カルシウム、酪酸カルシウム、次亜りん酸カルシウム、よう化カルシウム、乳酸カルシウム、硝酸カルシウム、亜硝酸カルシウム、酸化カルシウム、りん酸カルシウム（第一）、水酸化カルシウムなどの可溶性カルシウム塩が好ましく例示される。通常溶液のカルシウム濃度が0.0008%以上となるように調整して用いられる。

アルギン酸ナトリウムに混入されるワクチンの有効成分としては、例えばニューカッスル病

弱毒生ウイルス、鶏伝染性ファブリキウス病弱毒生ウイルス、鶏脳脊髄炎生ウイルス、鶏気管支炎弱毒生ウイルスなど、現在経口投与あるいは飲水投与されているものが例示できる。

特に本発明の特徴の一つは、上記アルギン酸ナトリウム粒子に含有させるワクチンの有効成分が鶏コクシジウム原虫のオーシストであり、これにより粒子状ワクチンとして鶏コクシジウム症生ワクチンを作製、提供するところにある。

本発明の鶏コクシジウム症生ワクチンにより、飼料投与の形式で弱毒の種鶏に対し数量を調整して上記種のオーシストを投与でき、軽度の感染を起こさせて免疫を付与することができる。

鶏コクシジウム症生ワクチンの製法に本発明の製造方法を適用した場合、例えば500mlの2%アルギン酸ナトリウム液に1260000コの鶏コクシジウムオーシスト（1コの長径： $20 \sim 25 \mu\text{m}$ ）を混合し、236注射針を用いて液を滴下

1 1

すれば、液1滴内に含まれるオーシスト数は20滴の平均で計算上 24.1 ± 6.1 であり、一方、形成された粒子1コ内に含まれるオーシスト数は10コ平均で 24.3 ± 6.5 である。従って鶏の飼料の摂取量から、これに添加する粒子状生ワクチンの個数、1コ当りのオーシスト数を、適宜かつ容易に調整でき、希望する軽度の感染による免疫付与ができる。また上記2%アルギン酸ナトリウム液を使用した結果から、粒子作製の操作においてワクチン材料の損失が少なく有効利用が図られる効果のあることも分かる。

また本発明により製造される飼料投与用の粒子状生ワクチンは、上述の如く免疫増強剤、保存料、抗生物質、抗真菌剤、着色料、着香料等を併せて混入させることが可能である。このうちの保存料及び抗生物質はワクチンへの細菌の混入、増殖等を防ぎ、結果としてワクチンの品質を確保するもので、例えば下記のもの为例示される。

保 存 料：安息香酸、安息香酸ナトリウム、バ

1 2

ラオキシ安息香酸エステル類、ソルビン酸、デヒドロ酢酸、デヒドロ酢酸ナトリウム、プロピオン酸カルシウム、プロピオン酸ナトリウムなど

抗生物質：ペニシリンGカリウム、ペニシリンGナトリウム、硫酸ストレプトマイシン、硫酸カナマイシン、クロルテトラサイクリンなど

また着色剤（例えば食紅等）の混入によって、作製する粒子状生ワクチンを着色した場合には、飼料への混入の操作、混入飼料の取扱い上便利である他、鶏による摂取増進も期待されるという視覚的効果を高め、取扱を便利にする作用を有する。このような着色料としては、例えば赤色2号（アマランス）、赤色102号（ニューコクシン）、赤色6号（アッシュドレッド）、黄色4号（タートラジン）、黄色5号（サンセットイエローFCF）、青色1号（ブリリアントブルーFCF）、赤色104号（フロキシン）、赤色105号（ローズベンガル）などが使用でき

る。

本発明の粒子状生ワクチンは、特に粉飼料（1mm以下程度の粉状飼料）に混合した場合には、アルギン酸ナトリウム粒子の表面に粉飼料が付着被覆することになるため好ましく、鶏の前期飼料用として特に好適である。また混合飼料は生ワクチンの予防剤（例えば鶏コクシジウム原虫の場合には抗コクシジウム剤）を含まないものとして調製される。

（発明の効果）

本発明によれば、飼料投与用として適した生ワクチンの提供できるという効果があり、またかかる生ワクチンを簡単に作製することができる効果がある。

また更に本発明によれば、鶏コクシジウム症生ワクチンとして、飼料内投与によって感染の度合を調整することが容易であるワクチンを提供でき、投与労力の低減、他剤の併用、摂取量の均一化等の優れた効果を得ることができ

15

る。中に浮遊させた。この上澄みに約5倍量の水道水を加え、遠心操作によりオーシストを沈澱させて集めた。以上の操作により鶏糞由来の雑物は大部分除去でき、オーシストが濃縮、収集された。このオーシストを再度水道水で洗浄した後、2%重クロム酸カリウム液に浮遊させ、35℃で5日間培養し感染性を付与した。

次に、感染性を有したオーシストの数量を数え、希釈（または場合により濃縮）によりワクチン作製量に調整した後、下記の冷却クロム酸液（約10倍量）を氷冷下で遠心操作時間まで含めて約10分間作用させ、オーシストを滅菌した。この滅菌オーシストを冷却滅菌蒸留水で十分洗浄し、クロム酸を除去した。以上でワクチン用オーシストの調整を終了した。

クロム酸液：20% (w/v) 重クロム酸ナトリウム液
1容を、氷冷下で濃硫酸1容と混合し、析出した結晶をガラスフィルターで濾過した液体。

アルギン酸ナトリウム粒子の作製

（実施例）

以下本発明のアルギン酸ナトリウムを使用した粒子状生ワクチンの具体的な製造例について説明するが、本発明がこれに限定されるものではないことは当然である。

実施例1

（鶏コクシジウム症ワクチンの作製）

オーシストの調製

2～4週齢SPF鶏（財団法人：日本生物化学研究所において保有する系統ラインM）に50000コ／羽のアイメリア テネラ、また4～6週齢SPF鶏に30000コ／羽のアイメリアネカテリックスオーシストを経口接種し、それぞれ接種後7～10日の鶏糞を採取した。この鶏糞に大量（鶏糞の5倍量以上）の洗浄液（ライボンプ水溶液 1.5ml / 水道水 1ml）を混合し、網（30メッシュ）で濾過して濾液中にオーシストを集めた。この濾液を遠心（400×5）し、その沈澱に約3倍量の飽和食塩水を加えて攪拌した後、再遠心してオーシストを飽和食塩水（上澄

16

液）に再懸濁させた。この上澄みに約5倍量の水道水を加え、遠心操作によりオーシストを沈澱させて集めた。以上の操作により鶏糞由来の雑物は大部分除去でき、オーシストが濃縮、収集された。このオーシストを再度水道水で洗浄した後、2%重クロム酸カリウム液に浮遊させ、35℃で5日間培養し感染性を付与した。

1. 2.2% アルギン酸ナトリウム液

（110℃、20分間加熱滅菌）

アルギン酸ナトリウム・・・0.4g

蒸留水・・・374 ml

2. オーシスト浮遊液（110℃、20分間加熱滅菌）

浮遊液

食用色素 赤色2号・・・0.125g

蒸留水・・・40 ml

オーシスト

アイメリア テネラ・・・5×10⁵コ以上

アイメリア ネカテリックス
・・・1×10⁵コ以上

（浮遊液を加熱滅菌した後、滅菌オーシストを混合した）

3. ソルビン酸液（防腐剤として用いる：加熱滅菌不可）

ソルビン酸・・・0.21g

エタールアルコール・・・2.1ml

4. 5% 塩化カルシウム液（110℃、20分間加熱滅菌）

17

18

塩化カルシウム 25 g
 食用色素 赤色 2 号 0.15 g
 蒸留水 500 ml

- (1) 以上の溶液 1、2、3 を製造前に無菌的に混合し、よく攪拌した。
- (2) この混合液をポンプで管を通して滴下装置に送液した。
- (3) 滴下装置の下部に上記 4 の 5% 塩化カルシウム液を入れたビーカーを設置し、上記 (1) の混合液の滴下を受ける。
- (4) 混合液は即座に固形化し、粒子形成により滴下終了した。

作製された粒子を 30 メッシュの網に受け、滅菌蒸留水でよく洗淨した。

- (5) 粒子作製後、下部に網を敷いた滅菌ステンレスボットに粒子を入れ、冷蔵庫に 3 日間保存（保存温度 4～6℃）して余分の液体を除去した。
- (6) この粒子を滅菌ワクチン瓶に 1000 ドーズ（240g）づつ分注した。

19

上記表 1 の結果から、粒子を直接投与した場合、個体間における摂取数のバラツキが大きく、少数の粒子を取込んだ鶏の成績に影響されて平均摂取数は低くなっていることが分る。この成績から、アルギン酸ナトリウム粒子自体には、鶏は積極的な興味または食欲は示さないように推察される。一方、飼料添加の場合、投与粒子数の増加に伴ない、摂取数は増加する傾向がみられる。飼料投与の場合、粒子は表面を飼料に覆われ、一見粗大な飼料粒と区別できなくなり、嗜好性あるいは興味による個体差は殆んど消失するように考えられる。従って鶏の日齢に適した量の飼料に 20～50 コの粒子を混合することによりワクチン投与が可能であることが分る。

（鶏への投与試験）

上記により作製した粒子状生ワクチンを飼料中に投与する条件を規定するため、各群 10 羽の 1 週齢 SPF 鶏を空腹状態におき、30、50 及び 100 コ／羽の赤色に着色した粒子（直径 2.5mm）を直接そのまま、またはそれぞれ 0.5g／羽（約 0.008g/g 体重）の飼料と混合して投与した。

投与 30 分後に鶏を殺して、素腸、腸胃及び筋胃中の粒子を計数し、平均摂取数及び希望接種数に対するその比率を算出し、その結果を下記表 1 に示した。

表 1

投与 粒子数	直接投与		飼料混合	
	平均値	比率	平均値	比率
30	16.4	44.7%	20.6	59%
50	10.4	20.8	28.3	57
100	5.6	5.6	52.3	52

ただし上記表中において

平均値：各群 10 羽の平均粒子摂取数

比率：投与粒子数に対する平均摂取数の比

20

